

Der Nachweis von Antidiphthin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nana Maurer geb. Hellmuth

aus Würzburg

1968

Marburg 1967

Der Nachweis von Antidiphthin



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nana Maurer geb. Hellmuth

aus Würzburg

Marburg 1967



Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Philipps-
Universität Marburg an der Lahn am 1.2.1968
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Professor Dr.med. R. Siegert

Referent: Privatdozent Dr. med. W. Schiff

Correferent: Professor Dr.med. et Dr.med.dent. H. Heuser

Inhaltsverzeichnis

=====

	<u>Seite</u>
I. Einleitung	1
II. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse	4
A. Zur Methodik	4
B. Der Nachweis von Antidiphthin mittels des serologischen Maustests	6
C. Gewinnung von Antidiphthinseren beim Kaninchen	14
D. Untersuchungen zur Frage der Bindung zwischen Diphthin und Antidiphthin	16
III. Besprechung	20
IV. Zusammenfassung	23
V. Literatur	24



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554409_0036

I. EINLEITUNG

=====

Diphthin ist ein atoxisches, hitzestabiles Polypeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 15.000 (SCHIFF, 1964e). Diese Substanz wird sowohl von toxischen als auch atoxigenen Stämmen von *C. diphtheriae* sowie von *C. pseudodiphtheriticum* gebildet. Andere Corynebakterienspezies sind offensichtlich nicht zur Diphthinbildung befähigt (SCHIFF, SPELSBERG und GERBERSHAGEN, 1962). Im Tierexperiment (bei Kaninchen, Meer-schweinchen oder Mäusen) bewirkt intravenös injiziertes Diphthin eine Titerreduktion von bestimmten heterospezifischen Immunnämagglutininen oder -hämolysinen, gleichgültig, ob solche Immunseren vor oder nach einer Diphthininjektion (i.v.) oder in Mischung mit Diphthin appliziert werden. Wird hingegen ein tierspezifisches Immunnämagglutinin (oder -hämolysin) benutzt, so vermag Diphthin die Versuchstiere vor dem Hämolysetod durch 6 - 8 Letaldosen eines derartigen Serums zu schützen (SCHIFF, 1964a; 1964b). In beiden Fällen ist die diphthinbedingte Antikörperhemmwirkung serologisch in vitro nicht nachweisbar, sondern äußert sich als solche erst innerhalb des tierischen Organismus (SCHIFF, 1961b). Wie neueste Untersuchungen darauf hinweisen, scheint dieser Effekt des Diphthins auf einer fermentativen Spaltung von IgG-Globulin zu beruhen (SCHIFF und Mitarbeiter, noch unveröffentlicht).

Vorgenanntes Hämolyse-schutzphänomen ist bereits von SEEMÜLLER (1943) beobachtet und von ihm als ein Effekt des Diphthintoxins bzw. als Folge einer humoralen Umwandlung von Häm-agglutinin in Diphtherie-Antitoxin gedeutet worden. In zahlreichen Mitteilungen versuchte er, seine in der Literatur als SEEMÜLLER-Phänomen bezeichneten Beobachtungen zu klären (Überblick s. bei SCHIFF, 1964d). Hierbei sind von ihm unter anderem folgende Feststellungen getroffen worden: Die Hämolyse-schutz-wirkung des vermeintlichen Diphtherie-Toxins wird durch Zusatz von Diphtherie-Antitoxin (vom Pferd) aufgehoben. Andererseits

hängt die Hämolyseschutzwirkung davon ab, in welcher Reihenfolge Hämagglutinin, Di-Toxin und Di-Antitoxin gemischt werden. Mischt man zuerst Toxin mit Antitoxin, so findet keine Hämagglutininbindung statt, da die Avidität des Di-Antigens zu seinem spezifischen Antikörper größer sei als zum Hämagglutinin. Wird das Di-Serum aber gleichzeitig mit dem Hämagglutinin und dem Toxin gemischt, so werden je nach der tierischen Herkunft des Antitoxins unterschiedliche Resultate erhalten: Bei Di-Seren vom Meerschweinchen oder Kaninchen bleibt das Hämagglutininbindungsvermögen des Toxins erhalten, bei Di-Seren vom Pferd oder Rind gehe es hingegen verloren.

Mit dem Nachweis des Diphthins erschienen diese toxinbezogenen Versuchsdeutungen SEEMÜLLERS sehr unwahrscheinlich, da SCHIFFs Versuchsergebnisse dafür sprachen, daß vorstehenden Beobachtungen SEEMÜLLERS eine Reaktion zwischen Di-Serum und Diphthin zugrundeliegt. Mittels des von ihm entwickelten serologischen Tierversuchs stellte nämlich SCHIFF (1961a; 1964a) fest, daß der Hämolyseschutzstoff Diphthin durch einen in Di-Seren enthaltenden diphthinspezifischen Antikörper neutralisiert wird. Diese Bindung zwischen Diphthin und Antidiphthin schließt aber eine zusätzliche Fixierung von Hämagglutinin aus und umgekehrt. Ferner ergab sich, daß streng zwischen den beiden voneinander unabhängigen Immunreaktionen Diphthin/Antidiphthin und Di-Toxin/Antitoxin (im engeren Sinne) unterschieden werden muß: Während nämlich diese beiden Vorgänge innerhalb einer Stunde abgeschlossen sind, benötigt eine weitgehende Fixierung des Diphthins an Hämagglutinin mindestens neun Stunden. Bei ausreichenden Mengen Antidiphthin kann infolgedessen keine Bindung von Hämagglutinin an Diphthin erfolgen, da sich stets der viel raschere Reaktionsablauf zwischen Diphthin und Antidiphthin durchsetzt. Andererseits wird der diphthinneutralisierende Effekt des Antidiphthins um so mehr verringert, je länger eine Mischung von Hämagglutinin und Diphthin zuvor inkubiert worden ist. Nach 9-std. Vorinkubation ist letztere Bindung weitgehend abgeschlossen, so daß nachträglich zugesetztes Antidiphthin wirkungslos bleibt.

Bei Immunisationsversuchen mit Diphthin an Meerschweinchen und Mäusen gelang es SCHIFF nicht, diesen diphthinspezifischen Antikörper Antidiphthin nachzuweisen (SCHIFF, 1964b). Möglicherweise war dies darauf zurückzuführen, daß das Diphthin aufgrund seines relativ niedrigen Molekulargewichts von ca. 15.000 bei diesen Labortieren nur eine geringe antigene Wirksamkeit besitzt oder aber, daß diese Labortiere (im Gegensatz zum Pferd) schlechte Antidiphthinbildner sind. Aufgabe vorliegender Arbeit war es daher, durch Immunisierung von Kaninchen mit Diphthin bzw. diphthinhaltigen Substraten die Existenz des Antidiphthins nachzuweisen.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

A. Zur Methodik

1. Reinigung von Diphthin: Die Gewinnung von Diphthin erfolgte nach dem von SCHIFF angegebenen Verfahren (1964c) aus Kulturfiltraten des atoxigenen Di-Bakterienstammes 29619 (10-tägige Bebrütung in Popebouillon bei 33°C). Im wesentlichen handelt es sich hierbei um eine Ausfällung diphthinreichen Materials mittels Salzsäure, Auflösung des Rückstandes in Wasser, Behandlung dieser Lösung mit einer homogenen Phenol-Wasser-Mischung in Wärme nach der Methode von WESTPHAL und Mitarbeitern (1952), Ausfällung des Diphthins aus der Phenolphase mittels Methanol und anschließender Gefriertrocknung. (Eine 0,02%ige gepufferte Lösung von Diphthin-Reinsubstanz besitzt eine dosis inhibicans minima*) von etwa 0,0025 ml.) Die Diphthintrockensubstanz wurde bei + 5°C verschlossen aufbewahrt. Für jeden Versuch sind frisch angesetzte Lösungen verwendet worden.

2. Immunseren: Die hämagglutinierenden (hämolyisierenden) Anti-Schafblut- und Anti-Meerschweinchenblut-Immunseren sind durch Immunisierung von Kaninchen mit entsprechenden Blutkörperchen gewonnen worden. Verwendet wurden jeweils Mischseren von 2 - 3 Tieren, die nach Inaktivierung (30 min. bei 56°C) bei - 15°C eingefroren wurden. Die Herstellung der Antidiphthinseren erfolgte nach dem in der Tabelle 6 angegebenen Modus. Die einzelnen Seren sind ebenfalls bei - 5°C aufbewahrt worden. Das verwendete Di-Antitoxin war ein Fermo-Serum vom Pferd

*) 1 dim ist die Diphthin-Mindestmenge, welche die in 0,05 ml Ambozeptor (Titer 1 : 4000) enthaltenen Anti-Schaf-Hämagglutinine intravital im serologischen Test an der Maus (25g) nach einer vorausgegangenen 6-std. Inkubierung des Ambozeptor-Diphthin-Gemischs maximal hemmt (SCHIFF, 1964a).

(Op.-Nr. 6865)*) mit einem Gehalt an 1000 I.E./ml.

3. Serologischer Maustest: Die angegebenen Einzeldosen beziehen sich auf 25 g/Maus. Die intravenöse Injektion erfolgte in eine Schwanzvene. 24 Stdn. post inj. wurden die Mäuse entblutet und die Anti-Schaf-Hämagglutinin-Titer der inaktivierten Seren bestimmt.

4. Hämagglutinations-Reaktion (Röhrchen-Verdünnungstest): Zu je 0,15 ml der einzelnen Serum-Verdünnungsstufen wurden 0,15 ml einer 1%igen Suspension von Schaf- oder Meerschweinchen-Blutkörperchen gegeben. Die Ablesung erfolgte nach 1-std. Stehen bei Zimmertemperatur und anschließendem kurzen Zentrifugieren bei niedriger Drehzahl.

5. Hämolys-Reaktion (Röhrchen-Verdünnungstest): Zu je 0,2 ml der einzelnen Serum-Verdünnungsstufen wurden 0,2 ml auf 1/20 verdünntem Meerschweinchen-Komplement und 0,2 ml einer 1%igen Suspension von Schaf- oder Meerschweinchen-Blutkörperchen hinzugefügt. Nach 20 min. Inkubierung im 37°C-Wasserbad wurde abgelesen.

6. Komplementbindungs-Reaktion: Es wurden je 0,25 ml auf 1/2 verdünntes Antidiphthinserum mit 0,25 ml fallender Mengen Meerschweinchen-Komplement und 0,25 ml auf 1/4 verdünnter Diphthinstammlösung (1 mg Diphthin gelöst in 5 ml Phosphatpuffer, pH 7,3) gemischt. Nach 1-std. Inkubierung im 37°C-Wasserbad wurde je Gläschen eine 1-std. inkubierte Mischung von 0,25 ml auf 1/2000 verdünntem Anti-Schaf-Hämagglutinin und 0,25 ml einer 2%igen Schafblutkörperchen-Suspension hinzugegeben. Die Ablesung erfolgte nach 20 min. Inkubierung bei 37°C.

*) Behringwerke AG., Marburg/Lahn.

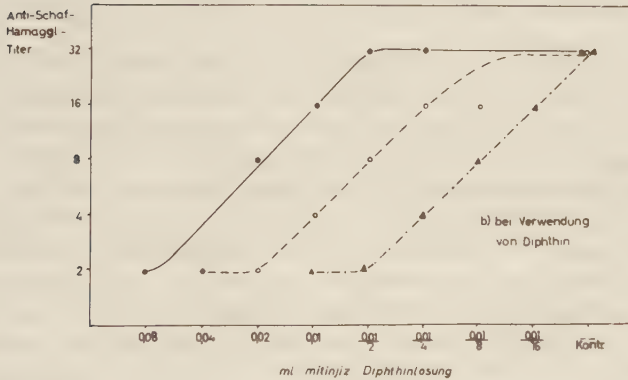
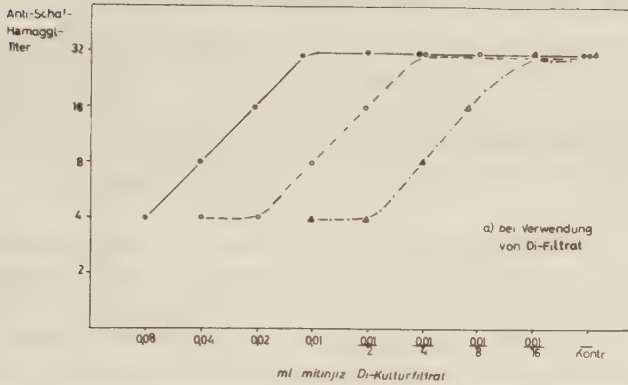
B. Der Nachweis von Antidiphthin mittels des serologischen Maustests

Nach SCHIFF (1964a) verläuft die Reaktion zwischen Diphthin und Hämagglutinin (Hämolysin) bedeutend langsamer ab als zwischen Diphthin und Antidiphthin. So ist die Diphthinwirkung nach 1, 3 bzw. 9-std. Inkubierung mit Hämagglutinin um das 4, 16 bzw. 32fache stärker als bei i.v. Injektion sofort nach Mischung. Im Gegensatz hierzu ist die Bindung zwischen Diphthin und Antidiphthin bereits nach längstens 30 min. abgeschlossen (SCHIFF, 1964c). Diese Feststellung traf er bei Versuchen mit Di-Toxin oder atoxischem Di-Kulturfiltrat und Fermo-Di-Antitoxin vom Pferd (SCHIFF, 1964c).

Da SCHIFF für seine Versuche ausschließlich Di-Toxin oder atoxisches Di-Kulturfiltrat verwendet hatte und in nachstehenden Untersuchungen fast ausnahmslos Diphthin-Reinsubstanz verwendet wurde, ist zunächst überprüft worden, ob auch in letzterem Falle dieselbe Abhängigkeit des Diphthineffekts von der Inkubationsdauer besteht.

Bei diesem Versuch wurden in 3 parallelen Ansätzen Mischungen von jeweils 0,05 ml Anti-Schafblut-Immunserum von Kaninchen und 0,1 ml fallender Verdünnungen von Di-Kulturfiltrat verwendet. Nach Zusatz von 0,25 ml NaCl-Lösung wurden die einzelnen Mischungen jeweils einer Maus (Einzeldosis 0,4 ml/25 g) i.v. injiziert, und zwar a) unmittelbar nach Mischung, b) nach 30 min. und c) nach 6-std. Inkubation bei 22°C. 24 Stdn. post inj. sind die Mäuse entblutet und die Anti-Schaf-Hämagglutinin-Titer der Mäuseseren bestimmt worden. In einem analogen Versuch wurde statt Di-Kulturfiltrat eine 0,02%ige Diphthin-Lösung verwendet.

Die in der Abbildung 1 angeführten Ergebnisse dieser serologischen Mausversuche zeigen eine weitgehende Übereinstimmung der hämagglutininhemmenden Wirksamkeit von Di-Kulturfiltrat und Diphthin-Reinsubstanz. Gemessen an den basalen Umschlagspunkten der einzelnen Dosis-Wirkungskurven ergab sich, daß nach 30 min. oder 6-std. Inkubierung nur 1/4 bzw. 1/16 der Di-Kulturfiltratmenge bzw. Diphthinmenge nötig war wie bei Injektion ohne Inkubierung. Diese Resultate stimmen mit den Befunden von SCHIFF (1964a) überein.



Es bedeuten:

- — Titer ohne Inkubation von (0.05 ml) Amboz. + (0.2 ml) Di-Filtrat bzw. Diphthins (0.002 %ig)
- — — — — — " nach 30 min. Ink. " " " " " " " " " " " "
- △ — — — — — " nach 6 stünd. Ink. " " " " " " " " " " " "

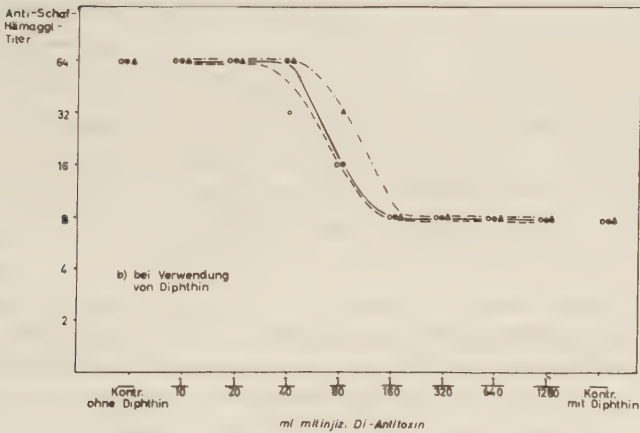
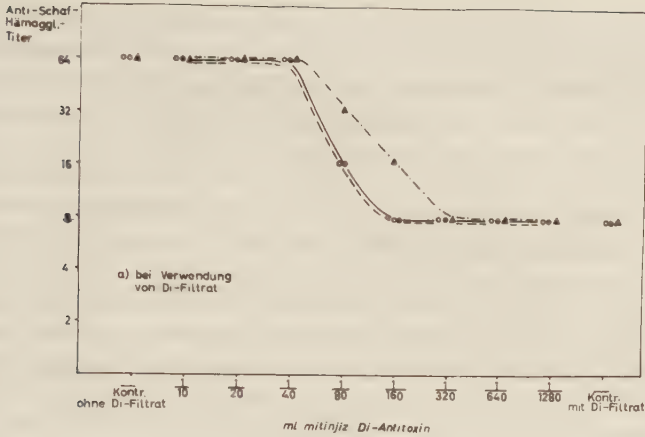
Abbildung 1: Anti-Schaf-Hämagglutinin-Titer nach i.v. Injektion von Ambozeptor und Di-Kulturfiltrat bzw. Diphthin-Lösung nach verschieden langer Inkubationszeit.

Für die Vergleichsprüfung der diphthinneutralisierenden Wirkung von Di-Antitoxin verwendeten wir dasselbe Di-Kulturfiltrat und dieselbe Diphthin-Lösung.

Hierbei wurden jeweils (pro Einzeldosis) 0,1 ml fallender Mengen Di-Antitoxin und 0,1 ml auf 1/40 verdünntes Kulturfiltrat a) sofort nach Mischung, b) nach 30 min. und c) nach 6-std. Inkubierung bei 22°C mit je 0,1 ml auf 1/2 verdünntem Anti-Schafbluthämagglutinin gemischt. Nach zusätzlicher 1-std. Inkubierung wurden die einzelnen Gemische Mäusen i.v. injiziert. Ein zweiter, identischer Versuch wurde mit 0,1 ml auf 1/40 verdünnter Diphthin-Lösung (0,002%) pro Einzeldosis durchgeführt.

Die in der Abbildung 2 wiedergegebenen Befunde besagen, daß übereinstimmend bei Di-Kulturfiltrat und Diphthin-Lösung sich bei unterschiedlich langer Vorinkubierung jeweils weitgehend derselbe Hämagglutinineffekt einstellt. Diese serologischen Befunde decken sich mit den Versuchsergebnissen von SCHIFF (1964c) und besagen, daß die Reaktion zwischen Diphthin und Antidiphthin bereits nach 30 min. Inkubierung abgeschlossen ist.

Aus der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeit, mit der die Bindung zwischen Diphthin und Hämagglutinin sowie zwischen Diphthin und Antidiphthin abläuft, ergibt sich der in der Tabelle 1 angeführte serologische Maustest zum Nachweis von Antidiphthin. Aufgrund vorstehender Ergebnisse dürfte hierbei eine vorausgehende 1-std. Inkubation von antidiphthinhaltigem Serum mit Diphthin als völlig ausreichend für dessen Neutralisierung gelten. Andererseits wurde aus zeitlichen Gründen die Zeit der Nachinkubierung mit Hämagglutinin von optimal ca. 9 Stunden auf 3 Stunden verringert; die hierdurch gegebene Gefahr wurde dadurch vermieden, daß die benutzte Diphthinmenge auf 4 dim erhöht wurde. Das wiedergegebene Versuchsbeispiel zeigt folgendes: Der im Serum der Mäuse Nr. 1 und 2 festgestellte Hämagglutinin-Titer von 1 : 32 wurde infolge der vorausgegangenen Inkubierung des Anti-Schafblut-Hämagglutinins mit Diphthin (s. Mäuse Nr. 3 und 4) auf 1 : 4 vermindert. Diese Titerreduktion unterblieb bei zusätzlicher Vorinkubierung des Diphthins mit Antidiphthinserum (s. Mäuse Nr. 5 und 6), was als spezifischer Antidiphthineffekt anzusehen ist.



Es bedeuten:
 o — Titer ohne Inkubation von (je 0,1 ml) Di-AT + Di-F. bzw. Diphthinls. (0,002 %ig)
 o — — — — — nach 30 min. Ink. " " " " " " "
 ▲ — — — — — nach 6 stünd. Ink. " " " " " " "
 u. enschl. 3 stünd. Ink. mit (0,05 ml) Amboz.

Abbildung 2: Anti-Schaf-Hämagglutinin-Titer nach i.v. Injektion von Anti-Schafblut-Immunsrum, Di-Antitoxin (Pferd) und Di-Kulturfiltrat bzw. Diphthin-Lösung nach verschieden langer Inkubationszeit.

Tabelle 1: Serologischer Maustest zum qualitativen
Nachweis von Antidiphthin.

Inj.-Gemische (pro 25 g Maus)	1	2	3			
Antidiphthin-Serum 1/ 2			0,1			
Diphthin-L. (0,02 %) 1/10		0,1	0,1			
NaCl-L.	0,2	0,1				
1 Std. Zimmer-Temp.						
Ambozeptor 1/ 2	0,1	0,1	0,1			
NaCl-L.	0,1	0,1	0,1			
nach 3-std. Inkubierung i.v. Injektion bei Mäusen; nach 20 Stdn. entbluten.						
Anti-Schaf-Hämagglutinine						
Maus Nr.	1	2	3	4	5	6
Serum-Verd. 1) 1/ 2	+++	+++	++	++	+++	+++
" " 2) 4	+++	+++	+	+	+++	+++
" " 3) 8	+++	+++	-	-	+++	+++
" " 4) 16	++	++	-	-	++	++
" " 5) 32	+	+	-	-	+	+
" " 6) 64	-	-	-	-	-	-
" " 7) 128	-	-	-	-	-	-

Bei einer Verwendung abgestufter Verdünnungen eines Antidiphthinsersums ist es möglich, seinen Antidiphthingehalt quantitativ zu bestimmen. In der Tabelle 2 ist ein derartiges Versuchsbeispiel aufgeführt. Bei Zugrundelegung eines 50%igen Hämagglutinin-Hemmungseffekts besaß das Serum des vorliegenden Beispiels einen Antidiphthingehalt von etwa 1/6.

Bei diesem serologischen Antidiphthinnachweis taucht die Frage auf, ob hierbei nicht eine Hemmung des Diphthins durch zusätzliche, im zu prüfenden Serum enthaltene Hämagglutinine vorgetäuscht werden könnte. An eine solche Möglichkeit war umso mehr zu denken, da bereits von SEEMÜLLER (1945) ein derartiges Blockadephänomen beschrieben worden ist, und bei dessen serologischer Aufklärung durch SCHIFF (1964a) eine verminderte Diphthinwirkung infolge einer vorausgegangenen Bindung an Hämagglutinin nachgewiesen wurde. In entsprechenden Untersuchungen wurde versucht, diese Frage zu klären.

Für diese Versuche verwendeten wir hochtitrige antierythrozytäre Immunsere von Kaninchen, und zwar ein Anti-Meerschweinchen-Serum (Hämagglutinin-Titer gegen Meerschweinchen 1/16000, gegen Schaf 1/8; Hämolysin-Titer gegen Meerschweinchen keine, gegen Schaf 1/128) und ein Anti-Schafblut-Serum (Hämagglutinin-Titer gegen Schaf 1/8000, gegen Meerschweinchen 1/128; Hämolysin-Titer gegen Schaf 1/4800, gegen Meerschweinchen keine. Die Versuchsanordnung entsprach der des qualitativen Antidiphthin-Tests (s. Tabelle 1), wobei das Anti-Meerschweinchen-Immunserum unverdünnt und das Anti-Schaf-Serum auf 1/2 verdünnt benutzt wurden.

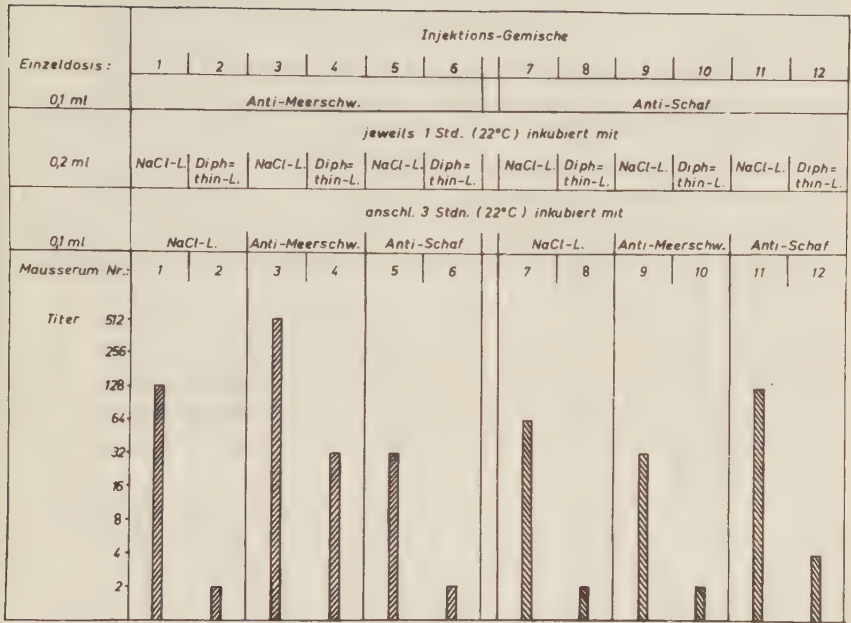
Aus der Abbildung 3 ist folgendes zu entnehmen: Nach alleiniger Injektion von Anti-Meerschweinchen- oder Anti-Schafblut-Immunserum (Injektions-Gemische 1 und 7) resultierten bei den entsprechenden Mäusen Nr. 1 und 7 Hämagglutinin-Titer von 1/128 bzw. 1/64. Nach Inkubierung mit Diphthin (Gemische 2 und 8) ergaben sich hingegen nur Titer von jeweils 1/2, was einer Titerreduktion um 6 bzw. 5 Stufen entspricht. Wurde nun in diesen Fällen nach der 1-std. Vorinkubierung nochmals dieselbe Menge des Immunhämagglutinins zugesetzt und diese Mischungen 3 Stdn. nachinkubiert, so waren zwar in den entsprechenden Mäuseseren wesentlich höhere Hämagglutinititer nachweisbar, doch bewirkte auch hier Mitinjektion von Diphthin eine Titerreduktion um 4 bzw. 5 Stufen (vgl. Maus Nr. 4 gegenüber 3 bzw. Maus Nr. 12 gegenüber 11).

Tabelle 2: Quantitative Bestimmung des Antidiphthingehalts eines Kaninchen-Immunserums im serologischen Maustest.

0,1 ml Antidiphthin-Serum Nr. 2*	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	(Kontrollen) NaCl-L.	NaCl-L.
je 1 Std. inkubiert mit 0,1 ml Diphthin-Lösung (0,002%ig)								NaCl-L.
anschl. 3 Stdn. inkubiert mit 0,2 ml $\frac{1}{4}$ Anti-Schaf-Hämaggl.								
24 Stdn. post inj. entbluten von Maus Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Serum-Verd. 1) 1/ 1	+++	+++	+++	++	+	+	+	+++
" " 2) 2	+++	+++	+++	+	-	-	-	+++
" " 3) 4	++	++	++	-	-	-	-	++
" " 4) 8	++	++	+	-	-	-	-	++
" " 5) 16	+	+	-	-	-	-	-	+
" " 6) 32	-	-	-	-	-	-	-	-

* nach 4-mal. Immunisierung (s.Tab.3)

Prinzipiell gleiche Resultate ergaben sich bei zwei weiteren analogen Versuchen, bei denen beide Immunchämagglutinine (Anti-Meerschweinchen und Anti-Schaf) in wechselnder Reihenfolge verwendet wurden (Gemische 5, 6, 9 und 10). Diese Versuche beweisen, daß durch den Gehalt eines Serums an Hämagglutininen bzw. Hämolyسين kein Antidiphthingehalt vorgetäuscht werden kann. Damit wird die Ansicht von SCHIFF (1964a) bestätigt, daß sich der offensichtlich sehr langsam auswirkende Diphthineffekt zusätzlich auch auf weitere Hämagglutinine erstrecken und daher von einem eigentlichen Blockadephänomen nicht gesprochen werden kann.



Es bedeuten:

- ▨ Anti-Meerschw.-Hämagglutinine
- ▨ Anti-Schaf-Hämagglutinine

Abbildung 3: Hämagglutininintiter bei 12 Mäusen 24 Stdn. nach intravenöser Injektion von Anti-Meerschweinchen- und Anti-Schafblut-Immunseren (Kaninchen) bei verschiedener Mischung mit und ohne Diphthinlösung (0,002%ig).

C. Gewinnung von Andidiphthinseren beim Kaninchen

Von SCHIFF (1964d) sind folgende Befunde als Hinweise für die Existenz eines diphthinspezifischen Antikörpers angesehen worden:

1. Im Gegensatz zur Hämagglutinin-Diphthin-Reaktion ist die Bindung zwischen Diphthin und Antidiphthin innerhalb weniger Minuten abgeschlossen, d.h. mit etwa der gleichen Geschwindigkeit wie eine Antigen-Antikörper-Reaktion.

2. Das Hämagglutininbindungsvermögen wird durch Di-Antitoxin (Antidiphthin) aufgehoben, so daß nachträglich einer solchen Mischung zugesetztes Hämagglutinin im tierischen Organismus nicht gehemmt wird.

3. Der toxinneutralisierende und der diphthinhemmende Effekt eines Di-Serums sind zwei verschiedene Vorgänge, da durch Diphthin die toxinneutralisierende Wirkung eines Di-Serums nicht beeinflußt wird und dessen diphthinhemmender Effekt ausschließlich von seinem Gehalt an Antidiphthin, nicht aber an Antitoxin abhängt.

Mit nachstehend berichteten Untersuchungen wurde versucht, durch Immunisierung von Kaninchen mit Diphthin zweifelsfreie Beweise für das Vorkommen von Antidiphthin zu erhalten. Da SCHIFFs erfolglosen Immunisationsversuchen eine i.v. Applikation von Diphthin zu Grunde lag und es außerdem denkbar war, daß infolge seines relativ geringen Molekulargewichts von ca. 15.000 das Diphthin ein schlechtes Antigen darstellt, sind die bei insgesamt 20 Kaninchen durchgeführten Immunisierungen subcutan vorgenommen worden. Hierbei wurden gemäß dem in der Tabelle 3 angeführten Plan jeweils 3 Tieren Lösungen von Diphthin allein, zusammen mit Freund'schem Adjuvans (komplett)*, zusammen mit menschlichem O-Serum oder zusammen mit menschlichem O-Serum und Freund'schem Adjuvans verabreicht; 2 weitere Tiere wurden mit atoxischem Di-Kulturfiltrat behandelt; zur Kontrolle erhielten je zwei Tiere subcutane Injektionen lediglich von Freund'schem Adjuvans, von menschlichem O-Serum oder deren Mischung.

*Firma Difco, Detroit 1, Mich.

Tabelle 3: Gewinnung von Antidiphthhin-Immunsereen bei Kaninchen.

Immunisiert mit:	Einzeldosis (1,0 ml)	Applikationsweise	Kanin- chen Nr.	Antidiphthhin- Titer (serolog. Maustest)
1. Diphthhin-Lösung	0,2 ml 0,02% + 0,8 ml NaCl-L.	6x; 8täg. Abstand	1 2 3	1/16 1/3 1/1
2. Diphthhin-Lösung + Freund.-Adju- vans (komplett)	0,8 ml 0,02% + 0,2 ml	6x; 8täg. Abstand, zusätzlich: 2 x 4 Wo. Abstand, 1 x 6 " " , 1 x 8täg. " " ,	4 5 6	1/32 1/16 1/8
3. Diphthhin-Lösung + O-Serum	0,2 ml 0,02% inkubiert + 0,8 ml) 18 Stdn. Z.T.	6x; 8täg. Abstand	7 8 9	0 0 0
4. Diphthhin-Lösung + O-Serum + Freund.-Adju- vans (komplett)	0,2 ml 0,02% inkubiert + 0,6 ml) 18 Stdn. Z.T. + 0,2 ml	6x; 8täg. Abstand, zusätzlich: 2 x 4 Wo. Abstand, 1 x 6 " " , 1 x 8täg. " " ,	10 11 12	0 0 0
5. Di-Kulturfiltrat 29619 (Pope.-B.)	1,0 ml	8x; 3-4täg. Abstand	13 14	1/8 1/8
6. Freund.-Adjuvans (komplett)	0,2 ml + 0,8 ml NaCl-L.	6x; 8täg. Abstand, zusätzlich: 2 x 4 Wo. Abstand, 1 x 6 " " , 1 x 8täg. " " ,	15 16	0 0
7. O-Serum	0,8 ml + 0,2 ml NaCl-L.	6x; 8täg. Abstand	17 18	0 0
8. O-Serum + Freund.-Adju- vans (komplett)	0,8 ml + 0,2 ml	6x; 8täg. Abstand, zusätzlich: 2 x 4 Wo. Abstand, 1 x 6 " " , 1 x 8täg. " " ,	19 20	0 0

Im Verlauf der Immunisierung sind den Kaninchen Serumproben entnommen worden, die mittels des qualitativen Maustests (s. Tabelle 1) auf ihren Antidiphthingehalt geprüft wurden. Im positiven Falle erfolgte dessen quantitative Bestimmung nach dem in der Tabelle 2 angegebenen Verfahren. Die im Verlauf der Immunisierung ermittelten Höchstitter sind in der Tabelle 3 unter Angabe des jeweiligen Immunisierungsmodus angeführt. Es zeigte sich, daß nur im Serum der Tiere, die mit Diphthin-Lösung oder mit Diphthin-Lösung und Freund'schem Adjuvans (jeweils 6-8mal in ein- bis mehrwöchigem Abstand) behandelt worden waren, ein Antidiphthin-Titer nachweisbar war. Dies war auch nach Immunisierung mit diphthinhaltigem Kulturfiltrat der Fall. Die festgestellten Titer lagen zwischen $1/1$ und $1/32$. Hierbei waren die höheren Titer im Serum jener Kaninchen zu vergleichen, bei denen eine Mitinjektion von Freund'schem Adjuvans erfolgte. Erwartungsgemäß traten nach alleiniger Injektion von Freund'schem Adjuvans oder menschlichem O-Serum oder einer Mischung von Freund'schem Adjuvans und O-Serum keine diphthinbindenden Eigenschaften im Serum auf. Merkwürdigerweise war dies aber auch dann der Fall, wenn das Diphthin zusammen mit O-Serum bzw. Diphthin in Mischung mit O-Serum und Freund'schem Adjuvans appliziert worden war. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, daß das an das menschliche IgG-Globulin bzw. an entsprechende Globulinspaltstücke gebundene Diphthin relativ rasch aus dem Blutkreislauf eliminiert wird bzw. nicht an die antikörperbildenden Zellen gelangt.

D. Untersuchungen zur Frage der Bindung zwischen Diphthin und Antidiphthin.

Nach SCHIFF (1964d) beeinträchtigt ein Zusatz von Diphthin nicht die toxinneutralisierende Wirkung eines Di-Serums. Nunmehr im Besitz von antitoxinfreien Antidiphthinseren war es möglich zu prüfen, ob umgekehrt auch durch Antidiphthin keine Neutralisierung von Di-Toxin erfolgt. Diese Versuche führten wir an Meerschweinchen durch.

Es wurden zwei verschiedene Di-Toxine (Op.-Nr. 3116 und 3209) mit einer dlm von je 0,0001 verwendet. Das benutzte Antidiphthins serum Nr. 5 (s. Tabelle 3) besaß einen Antidiphthintiter von 1/16. Jeweils zwei Meerschweinchen erhielten 2,0 ml folgender, 18 Stdn. bei 22°C inkubierter Mischungen subcutan injiziert:

- a) 1,0 ml Di-Toxinverdünnung (= 1 dlm) und 1,0 ml Antidiphthins serum (unverdünnt),
- b) 1,0 ml Di-Toxinverdünnung (= 1 dlm) und 1,0 ml Kaninchen-Normalserum (unverdünnt) sowie
- c) 1,0 ml Di-Toxinverdünnung (= 1 dlm) und 1,0 ml physiologische Kochsalzlösung.

Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß die Meerschweinchen, welche eine Mischung von Di-Toxin und Antidiphthin erhalten hatten, etwa zum gleichen Zeitpunkt starben wie die Kontrolltiere, denen Di-Toxin zusammen mit physiologischer Kochsalzlösung oder Kaninchen-Normalserum appliziert worden war. Das Antidiphthin übt somit keinen neutralisierenden Effekt auf das Di-Toxin aus, womit einmal mehr bewiesen ist, daß die Bindung zwischen Di-Toxin und Antitoxin sowie zwischen Diphthin und Antidiphthin zwei getrennte Reaktionen darstellen.

Des weiteren ließ sich bei Verwendung von Antidiphthin-Kaninchenserum mittels des Ouchterlony-Tests die von SCHIFF (1964d) mit Di-Seren vom Pferd gemachte Erfahrung bestätigen, daß die Bindung zwischen Diphthin und Antidiphthin ohne Präzipitatbildung abläuft. (Bei diesen Versuchen sind zwecks Erhöhung der Reaktionsempfindlichkeit die Kaninchen-Antidiphthinseren zuvor auf etwa 1/5 eingeeengt worden.) Auch erwies sich die Richtigkeit der Angabe SCHIFFs, daß der Diphthin/Antidiphthin-Komplex kein Komplement zu fixieren vermag. In der Tabelle 4 sind die mit zwei höhertitrigen Antidiphthinseren erhaltenen Befunde wiedergegeben. Es ist daraus ersichtlich, daß ohne und mit Diphthinzusatz der gleiche Hämolysegrad resultierte.

Bei letzteren Versuchen wurden je 0,25 ml auf 1/2 verdünnte Antidiphthinseren (Nativtiter jeweils 1/16) mit 0,25 ml fallender Komplementverdünnungen und 0,25 ml einer 0,005%igen Diphthin-Lösung gemischt und eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Hierauf erfolgte ein Zusatz von 0,5 ml hämolytischen Systems (0,25 ml auf 1/2000 verdünntes Anti-Schaf-Hämolysin, das 1 Std. bei 37°C mit 0,25 ml einer 2%igen Schafblutkörperchen-Suspension inkubiert worden war). Nach 20 min. Aufenthalt im 37°C-Wasserbad wurde abgelesen.

Tabelle 4: Versuch des Nachweises von komplementbindenden Antidiphthin-Antikörpern in diphthinspezifischen Kaninchen-Immunseren.

	a. Antidiphthin- Serum 5 (auf $\frac{1}{2}$ verd.)		b. Antidiphthin- Serum 6 (auf $\frac{1}{2}$ verd.)		c. NaCl-Lösung (Kontrolle)	
	NaCl- L.	Diph- thin- L.	NaCl- L.	Diph- thin- L.	NaCl- L.	Diph- thin- L.
Kompl. Verd. 1/10	k	k	k	k	k	k
" " 20	k	k	k	k	k	k
" " 30	k	k	k	k	k	k
" " 40	st	g	m	m	k	k
" " 60	g	0	0	0	k	k
" " 80	0	0	0	0	0	0

Es bedeuten:

k = komplette Hämolyse
 st = starke "
 m = mäßige "
 g = geringe "
 0 = keine "

Da indirekte Hämagglutinations-Reaktionen besonders empfindliche Methoden für den Nachweis von Antikörpern darstellen, wurde schließlich auch versucht, diese Verfahren zum Nachweis von Antidiphthin zu verwenden. Trotz vielfach abgewandelter Methodik war es uns nicht möglich, hiermit positive Befunde zu erzielen.

Als Antigenträger sind hierbei sowohl Kaninchen- wie Schaferythrozyten verwendet worden, und zwar sowohl normale wie tanninisierte und zugleich formalinisierte *). Jeweils 0,1 ml Sediment von normalen oder tanninisierten bzw. zusätzlich formalinisierten Erythrozyten wurden mit 1,0 ml einer 0,1%igen Lösung von Diphthin in physiologischer NaCl-Lösung 1 Std. bei 37°C oder in Glykokoll-Puffer (pH 8,2) unter gelegentlichem Aufschütteln inkubiert, worauf nach 3-maligem Waschen eine 2,5%ige Erythrozyten-Suspension in NaCl-Lösung hergestellt wurde. Zu 0,1 ml Antidiphthin-Serum sind jeweils 0,3 ml dieser 2,5%igen Suspensionen hinzugefügt worden. (Bei Verwendung von diphthinisierten Schafblutkörperchen sind die Kaninchen-Immunseren zuvor mit normalen bzw. tanninisierten Schaferythrozyten absorbiert worden.) Nach 3 Stdn. Stehen bei 22°C erfolgte die Ablesung.

*) bezogen von Burroughs Wellcome & Co., London.

III. BESPRECHUNG

=====

SCHIFFs Angaben über die Existenz eines diphthinspezifischen Antikörpers basierten auf Untersuchungen, bei denen einerseits Diphtherieseren vom Pferd und andererseits diphthinhaltige Kulturfiltrate von toxischen oder atoxigenen Diphtheriebakterien Verwendung fanden. Da derartige Seren und Filtrate eine größere Anzahl bekannter und unbekannter Antikörper bzw. Antigene besitzen können und das Diphthin selbst zwei unterschiedliche Bindungsqualitäten, nämlich eine immunspezifische und eine selektiv adsorptive (bzw. fermentative) besitzt, können sich bei Mischung solcher Seren und Filtrate eine schwer kontrollierbare Anzahl von Reaktionen abspielen. Zwar war es SCHIFF mittels des serologischen Mautests gelungen, diese Vorgänge näher zu analysieren, doch war ein zweifelsfreier Beweis für die Richtigkeit seiner Anschauungen erst durch eine erfolgreiche Immunisierung von Tieren mit Diphthin gegeben. Insbesondere galt es hierbei, ein antidiphthinhaltiges Serum zu gewinnen, das frei von Diphtherieantitoxin ist, zumal im Hinblick auf SEEMÜLLERS Theorien zu beweisen war, daß die Aktivität des Diphthins durch diesen Antikörper nicht beeinflusst wird.

Mit vorstehenden Untersuchungen konnte die Existenz von Antidiphthin eindeutig nachgewiesen werden. Da die Immunisierungsversuche u.a. auch mit Diphthin-Reinsubstanz ohne Adjuvans erfolgreich waren, besagt dies gleichzeitig, daß das Peptid Diphthin trotz seines relativ kleinen Molekulargewichts von etwa 15.000 (für Kaninchen) antigen wirksam ist. Gegenüber den von SCHIFF (1964c) in einigen Diphtherieseren vom Pferd mit der gleichen Methode nachgewiesenen Antidiphthintitern von $1/512$ sind die beim Kaninchen erzielten Titerwerte von im Höchstfall $1/32$ zwar sehr niedrig, doch könnten als Erklärung hierfür folgende Möglichkeiten in Betracht kommen:

1. Kaninchen sind schlechtere Antidiphthhinbildner als Pferde.
2. Zur Gewinnung von Di-Antitoxin vom Pferd erfolgt eine Hyperimmunisierung mit einer sehr großen Anzahl von Einzelinjektionen von Di-Toxoid bzw. Di-Toxin. 3. Das in Di-Toxin enthaltene Diphthhin ist bei di-immunisierten Pferden von besonders guter antigener Wirksamkeit. 4. Das von uns beachtete Immunisierungsschema war nicht optimal. Was die erstgenannte Möglichkeit betrifft, so erscheint die von SCHIFF (1965; 1966) mitgeteilte Erfahrung von besonderem Interesse, wonach die Fermentwirkung des Diphthhins sich offensichtlich nur auf IgG-Globuline vom Mensch und einiger weniger Tierarten (Affen und Kaninchen), hingegen nicht vom Pferd, Rind und Schaf erstreckt. Hieraus könnte gefolgert werden, daß solche Tiere (z.B. Kaninchen), deren Serumglobuline Diphthhin zu binden vermögen, schlechte Antidiphthhinbildner sind, da in diesem Fall das an die Globuline bzw. Globulinfragmente gebundene Diphthhin sehr rasch aus dem Blutkreislauf eliminiert wird (SCHIFF, 1964c, 1964e) bzw. nicht die antikörperbildenden Zellen erreicht. Ein derartiger Sachverhalt würde zudem mit der berichteten Erfahrung übereinstimmen, daß Kaninchen, die mit inkubierten Mischungen von Diphthhin und (diphthhinbindungsfähigem) Menschenserum immunisiert worden waren, überhaupt kein Diphthhin gebildet hatten.

Falls SCHIFFs neueste Befunde (noch unveröffentlicht) bestätigt werden, wonach das Diphthhin eine Protease mit strenger Substratspezifität darstellt, wäre das Antidiphthhin als ein Fermentantikörper anzusprechen, der die fermentativen Eigenschaften seines Antigens völlig neutralisiert. Zum Zeitpunkt der gegenwärtigen Kenntnisse ist dies insofern bemerkenswert, da bisher noch keine Substanzen gefunden wurden, die als sog. Fermentvergifter oder SH-Blocker das Diphthhin zu inaktivieren vermögen; hierzu sei erwähnt, daß dessen enzymatischer Effekt keiner Aktivierung durch SH-haltige Verbindungen bedarf. Da die Reaktion zwischen Diphthhin und Antidiphthhin ohne Komplementbindung oder Präzipitatbildung abläuft und die proteolytische Wirksamkeit des Diphthhins gegenüber bestimmten IgG-

Globulinen offenbar nicht durch die Spezifität der in dieser Globulinfraktion enthaltenen Antikörper beeinträchtigt wird, dürfte der serologische Maustest eine sehr zuverlässige Methode zur quantitativen Bestimmung des Antidiphthingehalts eines Serums darstellen. Wegen der Eindeutigkeit der hierbei erzielbaren serologischen Befunde ist dieser Test anderen Möglichkeiten des Antidiphthinnachweises, z.B. Nachweis einer Hemmung des Diphthineffekts im Hämolysechutzversuch oder einer Hemmung der Fragmentierung von IgG-Menschenglobulin mittels Agar- oder Immunoelektrophorese, vorzuziehen.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

=====

Ein diphthinspezifischer Antikörper ist bisher lediglich in Diphtherieseren vom Pferd nachgewiesen worden. Da das in Diphtherie-Rohtoxin enthaltene Diphthin ein relativ niedriges Molekulargewicht von ca. 15.000 besitzt, wurde untersucht, ob dieses atoxische Polypeptid beim Kaninchen antigen wirksam ist, bzw. ob durch Immunisierung mit Diphthin-Reinsubstanz (allein oder in Kombination mit Adjuvantien) antidiphthinhaltige, antitoxinfreie Immunseren gewonnen werden können. Hierbei bestanden bezüglich des Antidiphthin-Nachweises einige methodische Schwierigkeiten, da die Reaktion zwischen Diphthin und Antidiphthin ohne Komplementbindung oder Präzipitatabildung abläuft.

Diese Untersuchungen ergaben folgendes: Mittels des von SCHIFF angegebenen serologischen Maustests wurde im Serum der Kaninchen, die mit Diphthin allein oder zusammen mit Freund'schem Adjuvans immunisiert worden waren, Antidiphthin bis zu einem Titer von 1 : 32 nachgewiesen. Bemerkenswerterweise unterblieb die Antikörperbildung, falls gleichzeitig mit Diphthin (allein oder in Mischung mit Freund'schem Adjuvans) Menschenserum appliziert worden ist.

Bei Prüfung der Antidiphthinseren mittels verschiedener Modifikationen des indirekten Hämagglutinationstests konnten keine positiven Befunde erhalten werden.

V. LITERATUR

=====

- SCHIFF, W.: Untersuchungen zum Seemüller-Phänomen.
II. Mitteilung: Experimentelle Studien über
Antikörperbindung in vitro und in vivo.
Z.Immun.-Forsch. (1961a), 122, 79.
- SCHIFF, W.: Über einen in vivo wirksamen antihämolytischen
Schutzstoff ("Diphthin") aus Corynebakterien.
Path.Microbiol. (1961b), 24, 299.
- SCHIFF, W.: Über den Hämagglutininbindungs-Mechanismus des
Hämolyseschutzstoffes Diphthin.
Z.Immun.-Forsch. (1964a), 127, 266.
- SCHIFF, W.: Über den intravitalen Hämagglutininhemmungs-
Mechanismus von Diphthin.
Z.Immun.-Forsch. (1964b), 127, 296.
- SCHIFF, W.: Zur Frage der Bindung zwischen Diphthin und
Diphtherie-Antitoxin ("Antidiphthin").
Z.Immun.-Forsch. (1964c), 127, 400.
- SCHIFF, W.: Die Aufklärung des Seemüller-Phänomens.
Z.Immun.-Forsch. (1964d), 127, 469.
- SCHIFF, W.: Physikalisch-chemische und immunologische
Eigenschaften von gereinigtem Diphthin.
Z.Immun.-Forsch. (1964e), 127, 479.
- SCHIFF, W.: Immunelektrophoretische Auftrennung von Serum-
globulinen mittels Diphthin.
Zbl.Bakt. I Orig. (1965), 198, 261.
- SCHIFF, W.: Studies of structure and biological activity
of immunoglobulins by diphthin fragmentation.
Vortrag auf dem IX. Intern.Congr.Microbiol.
in Moskau am 25.8.1966.

- SCHIFF, W., SPELSBERG, E. und GERBERSHAGEN, H.-U.: Diphthimbildung als Unterscheidungsmerkmal zwischen *C. diphtheriae* und *C. paradiphtheriae* (*C. xerose*). Zbl.Bakt. I Orig. (1962), 186, 328.
- SEEMÜLLER, H.: Über ein paradoxes serologisches Phänomen: "Giftiges Serum wird durch Zusatz von Gift ungiftig". Schweiz.Z.Path.Bakt. (1943), 6, 335.
- WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O. und BISTER, F.: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z.Naturforsch. (1952), 7b, 148.

Herrn Professor Dr. med. R. SIEGERT danke ich für die mir in seinem Institut zur Verfügung gestellte Arbeitsmöglichkeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr.med. W. SCHIFF für die Überlassung des Themas und stets hilfsbereite Anleitung und Beratung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 2.8.1937 wurde ich, Nana Maurer, geb. Hellmuth, als erstes Kind des Dr. med.dent. Otto Hellmuth und dessen Ehefrau Dr. med.dent. Erna Maria, geb. Stamm, in Würzburg geboren. Von 1943 bis 1945 ging ich in Würzburg und anschließend in Retterode, Kreis Witzzenhausen, in die Volksschule. Ab 1948 besuchte ich das Realgymnasium in Hessisch-Lichtenau, von 1949 bis zum Abitur am 5.3.1958 die Heinrich-Schütz-Schule in Kassel.

Im Sommersemester 1958 begann ich das zahnmedizinische Studium an der Universität in München. Dort legte ich nach dem fünften Semester die zahnärztliche Vorprüfung ab.

Im Mai 1961 heiratete ich Dr. med.dent. Walter Maurer.

Vom Wintersemester 1961/62 an studierte ich in Marburg, wo ich am 24.8.1963 das zahnmedizinische Staatsexamen bestand.

Von November 1963 bis April 1964 war ich am Hygiene-Institut der Universität Marburg angestellt.

Seit Mai 1964 arbeite ich als Assistentin in der Praxis meines Mannes in Eppelborn.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in München: Ascher, Autrum, Bachmann, Büngeler, Butenand, Dane, Eger, Heiss, Karlson, von Lanz, Linzenmeier, Nie-mer, Romeis, Schug-Kösters, van Thiel, Wagner, Wallraff, von Werz, Wetterer, Wieland;

in Marburg: Braun-Falco, Gedigk, Hanack, Hennis, Hering, Heu-ser, Hornung, Janke, Kottmeyer, Löhr, Marx, Pant-ke, Maurath, Meyer, Nieth, Roger, Schadewald, Schmid, Siegert, Siess.

